CONCENTRATIONS DE BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAELENSIS DANS DES MILIEUX LOTIQUES TRAITÉS POUR LE CONTRÔLE DES POPULATIONS DE SIMULIDÉS en 1986.

Québec

88-00524/

Concentrations de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* dans des milieux lotiques traités pour le contrôle des populations de simulidés en 1986

Renaud Dostie, tech. de la faune
Pierrette Cardinal, microbiologiste
Pierre-Martin Marotte, biologiste

Service des études environnementales

GOUVERNEMENT DU QUEBEC
MINISTERE DE L'ENERGIE ET DES RESSOURCES
DIRECTION DE LA CONSERVATION

Québec, Mars 1987

75

REMERCIEMENTS

Nous remercions monsieur Serge R. Bizaillon pour sa participation à ce programme d'échantillonnage. Il travaille au Département de techniques d'aménagement cynégétique et halieutique du cégep de Hauterive et était responsable du projet expérimental de contrôle des populations larvaires de simulidés sur le territoire de la municipalité de Baie-Comeau. Nous le remercions également pour la révision du contenu de ce rapport. Nos remerciements s'adressent également à Monsieur Guy Parent pour la présentation des résultats et de la figure. Les analyses des échantillons ont été effectuées au laboratoire de microbiologie du ministère de l'Energie et des Ressources par madame Céline Blanchet. Terminons en soulignant que madame Anne Laroche a dactylographié ce rapport.

ERRATUM

Vous devriez lire,

- à la page 8 au dernier paragraphe: En effet le B.t.k. possède un cristal bipyramidal tandis que celui du B.t.i. est polymorphique (Gaugler et Finney, 1982).

RÉSUMÉ

Le cégep de Hauterive a entrepris, à l'été 1986, un programme d'injections de Bacillus thuringiensis var. israelensis (B.t.i.) dans des cours d'eau situés autour de la ville de Baie-Comeau. En collaboration avec cet organisme, le ministère de l'Énergie et des Ressources (M.E.R.) a réalisé un échantillonnage visant à quantifier les spores de B.t.i. dans l'eau. L'étude a été réalisée afin de vérifier si la présence de B.t.i. dans un cours d'eau pouvait interférer avec les résultats d'analyses des échantillons prélevés lors de pulvérisations de B.t. var. kurstaki utilisées contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

Deux ruisseaux ont été échantillonnés pour un total de 12 prélèvements. Les récoltes ont été effectuées sur une période de 24 heures à des distance de 0,1 et 1,5 km en aval du site d'injection. L'ensemble des concentrations détectées sont faibles. Elles varient de non détectées ($< 0{,}001 \times 10^4$ U.F.C./l) à $0{,}60 \times 10^4$ U.F.C./l. Ces concentrations auraient peu d'influence sur celles détectées par le M.E.R. dans les milieux lotiques situés à l'intérieur des aires traitées contre la tordeuse. Toutefois, on devrait tenir compte des programmes d'injections de B.t.i. lors de l'échantillonnage réalisé à l'extérieur des aires traitées ou relié à des études de persistance.

ABSTRACT

During the summer of 1986, the CEGEP of Hauterive carried out a series of injections of Bacillus thuringiensis var. israelensis (B.t.i.) in streams situated in the vicinity of Baie-Comeau. In collaboration with this organism, the ministère de l'Energie et des Ressources of Québec realized a sampling program aiming to measure B.t.i. spores in water. The study was done in order to check if the B.t.i. spores found in streams could interfere with the analysis results of samples collected after spraying with B.t. var. kurstaki used against the spruce budworm.

Two streams were sampled for a total of 12 samples. The sampling was carried out during a 24-hour period at 0.1 km and 1.5 km downstream from the injection site. All the concentrations were low and ranged from undetected ($< 0.001 \times 10^4$ C.F.U./l) to 0.60×10^4 C.F.U./l. These concentrations would not interfere with those detected by the M.E.R. in streams situated inside the areas treated against the spruce budworm. However, the B.t.i. injections should be considered when sampling outside the treated areas or in the context of persistence studies.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iii

RÉSUMÉ v

ABSTRACT vii

TABLE DES MATIÈRES ix

1. INTRODUCTION 1

2. PROGRAMME D'INJECTION 3

3. PROGRAMME D'ÉCHANTILLONNAGE 5

4. MÉTHODOLOGIE 7

4.1 Méthodologie d'échantillonnage 7
4.2 Méthodologie analytique 7

5. RÉSULTATS ET DISCUSSION 9

BIBLIOGRAPHIE 13

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, le ministère de l'Energie et des Ressources (M.E.R.) réalise des pulvérisations de Bacillus thuringiensis var. kurstaki (B.t.k) contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette (T.B.E.). Durant ces traitements, le M.E.R. effectue des prélèvements d'eau afin d'évaluer les concentrations de spores viables présentes dans différents milieux aquatiques. L'échantillonnage s'échelonne sur une longue période de temps en vue de connaître la persistance de l'insecticide.

Par ailleurs, pendant ces périodes de pulvérisations, des programmes d'injections de Bacillus thuringiensis var. israelensis (B.t.i.) peuvent être pratiqués sur le territoire de certaines municipalités pour contrôler les populations larvaires de simulidés. En effet, des municipalités, telles que celles de la Côte-Nord, par leur situation géographique et leur imposant réseau hydrographique, contiennent des milieux très favorables au développement des insectes piqueurs. Ces derniers et en particulier les mouches noires (simulidae) harassent les citoyens à chaque période estivale, contrecarrant souvent toute activité à l'extérieur et contribuent ainsi à réduire les conditions de vie et l'expansion touristique.

Devant ce problème, la ville de Baie-Comeau a décidé d'effectuer un contrôle par l'injection de B.t.i. dans les cours d'eau. Ces travaux ont été confiés au Cégep de Hauterive qui a été autorisé, à l'été 1986, à traiter les cours d'eau situés sur le territoire de Baie-Comeau pour contrôler les populations larvaires de simulidés.

Ainsi, les deux variétés de B.t. peuvent être utilisées sur un même territoire et être présentes dans les mêmes cours d'eau. De plus, les analyses microbiologiques effectuées dans les échantillons d'eau sont basés sur un décompte de spores et celles-ci sont d'apparence semblable pour les deux produits. Devant la probabilité d'interférence lorsque ces deux variétés de B.t. sont utilisées sur une même superficie, le M.E.R. a réalisé de façon préliminaire une étude visant à quantifier les spores de B.t.i. en milieu lotique.

2. PROGRAMME D'INJECTION

Un rayon de contrôle d'environ huit kilomètres a été défini autour de la ville de Baie-Comeau. À l'intérieur de ce territoire, un inventaire de tous les ruisseaux susceptibles d'être colonisés par les simulidés a été réalisé et plus de 500 points d'injection ont été localisés. Chacun d'eux a fait l'objet d'au moins un traitement pendant le programme de contrôle.

En 1986, ce projet s'est déroulé de mai à août. En effet, un gîte larvaire peut être constitué d'un grand nombre d'espèces, chacune ayant sa propre chronologie de développement. Certaines peuvent avoir jusqu'à quatre générations durant l'été. Les traitements sont donc échelonnés selon le stade du développement larvaire et les densités de populations. Notons que les deux ruisseaux échantillonnés pour ce projet n'avaient jamais été traités auparavant.

Le larvicide biologique employé est produit par la compagnie Zoecon Corp. sous le nom commercial de Tecknar HP-D^{MD}. La quantité utilisée à chaque station varie selon le débit du cours d'eau et a été évaluée selon la formule suivante: (S. Bizaillon, Comm. pers., 1987)

$$\text{Larvicide (litre)} = 1.06 \frac{\text{débit (l/sec)} \times 60 \text{ (sec/min)} \times \text{Durée injection (min)} \times \text{Concentration désirée (PPM)}}{10^6}$$

Le B.t.i. est mélangé dans 8,5 ou 15 litres d'eau selon le pulvérisateur employé et la concentration désirée est de 0,75 ppm. Durant 15 minutes, ce mélange est vaporisé manuellement à l'aide d'une pompe à la surface du cours d'eau, idéalement une quinzaine de mètres en amont de la zone colonisée par les larves.

3. PROGRAMME D'ECHANTILLONNAGE

Deux ruisseaux ont été sélectionnés pour réaliser cette étude, dont un à débit lent et un second rapide (Figure 1). Les récoltes ont été effectuées le 20 et 21 juin 1986 à deux stations situées respectivement à 0,1 et 1,5 km en aval du site d'injection. Un échantillon d'eau a été récolté dans chaque ruisseau avant l'opération. Pour connaître le maximum de spores dans chaque ruisseau, un échantillon a été prélevé immédiatement après l'injection à la station située à 100 m en aval. Par la suite, à chaque station, des récoltes ont été effectuées après 2 et 24 heures pour un total de 12 échantillons.

Parallèlement à l'échantillonnage et pour faciliter l'interprétation des résultats d'analyse, un dénombrement des spores a été calculé à partir de la préparation commerciale.

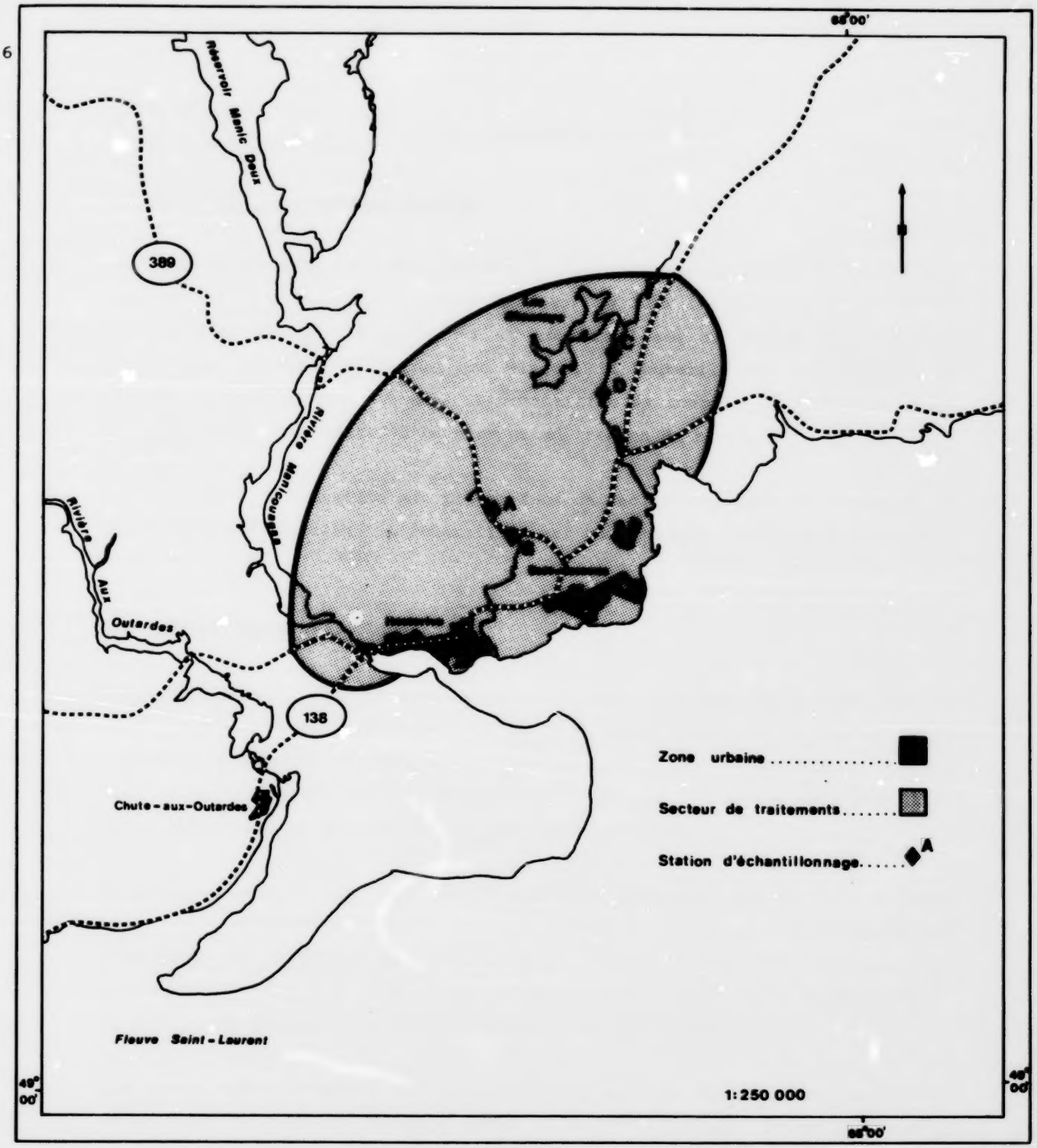

Figure 1: Zone traitée avec le B.t.i. sur le territoire de la municipalité de Baie-Comeau en 1986 et localisation des stations d'échantillonnage

4. METHODOLOGIE

4.1 Méthodologie d'échantillonnage

Tous les échantillons ont été prélevés à l'aide de bouteilles en polypropylène (946 ml) de type Boston. L'échantillonneur se lave les mains avec une solution antibactérienne (Hibitane^{MD}) et récolte l'eau au centre du ruisseau. A plusieurs reprises et durant une minute, la bouteille est introduite à la surface (0-2cm) du cours d'eau. L'échantillon se compose de plusieurs fractions et est représentatif d'un plus grand tronçon de rivière.

Par la suite, la bouteille est placée dans un sac de plastique et conservée au frais dans une glacière. L'échantillon est congelé dans les 12 heures suivant la récolte.

4.2 Méthodologie analytique

L'échantillon est préalablement pasteurisé (30 min. à 65°C) afin d'éliminer le plus grand nombre de contaminants et agité vigoureusement par la suite. Cette procédure n'affecte aucunement les spores de B.t. var. israelensis. Selon leur quantité estimée pour l'échantillon, l'analyse s'effectue soit par dilution, filtration ou par combinaison des deux méthodes.

La première méthode est utilisée lorsque l'on soupçonne une forte concentration. Elle consiste à prélever trois aliquotes de 0,1 ml de l'échantillon que l'on étale sur un milieu de culture PEMBA. Par la suite, des dilutions sont réalisées à partir de l'échantillon original (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) et pour chacune d'elle, la procédure citée précédemment est appliquée.

Les pétris sont incubés à 37° durant 24 heures. Le décompte est réalisé en choisissant les pétris contenant entre 30 et 300 colonies. Selon la quantité de colonies par plat de Pétri, certains sont réincubés pour une période totale de 40 heures. Ceci permet le développement de la spore et par le fait même la libération du cristal, protéine spécifique au B.t.. De ce(s) plat(s) de

Pétri, 20 colonies présentant les caractéristiques du B.t. (surface plate d'apparence rugueuse) sont sélectionnées. Par la suite, le pourcentage de B.t. est déterminé par la coloration Smirnoff qui met en évidence le cristal de B.t.. Cette méthode permet donc de différencier B.t. des autres bacilles qui présentent un aspect semblable sur la gélose.

Dans le cas où la quantité de spores estimée dans l'échantillon est faible, on procède à une analyse par filtration. Des volumes de 10 ml, 25 ml, 50 ml et 100 ml sont filtrés à l'aide d'une pompe à vide munie d'un entonnoir dans lequel on dispose une membrane filtrante de type Millipore^{MD} dont la porosité est de 0,45 µm. Après filtration du volume désiré, le filtre est déposé sur le milieu de culture PEMBA. Par la suite, la méthodologie citée au paragraphe précédent est utilisée pour le décompte et l'estimation du pourcentage de B.t. en ne considérant ici que les pétris contenant entre 20 et 80 colonies.

Puisqu'une colonie peut provenir d'une seule spore ou d'un amas de spores, les résultats sont exprimés en unité formant des colonies par litre d'eau (U.F.C. /l) plutôt qu'en nombre de spores viables par litre (Collins et Lyne, 1984). Etant donné aussi que l'analyse n'utilise pas le volume total de l'échantillon, les concentrations nulles sont exprimées comme non détectées (N.D.). La limite de détection est 0,001 x 10^4 U.F.C./l.

Il est important de mentionner que cette méthode ne permet pas de différencier le B.t. var. israelensis de kurstaki. En effet ces deux variétés de B.t. ont la caractéristique de former un cristal, corps protéique caractéristique au B.t. et une spore d'apparence très similaire. Il y aurait cependant une légère différence morphologique, difficile à discerner au microscope, au niveau du cristal. En effet le B.t.i. possède un cristal bipyramidal tandis que celui du B.t.k. est pléomorphique (Gaugler, 1982). Pour différencier avec certitude ces deux variétés de B.t. dans un même cours d'eau, il serait indispensable d'effectuer des analyses biochimiques ou immunologiques sur les microorganismes. Dans cette étude, cette vérification ne fut pas appliquée puisque les échantillons provenaient de cours d'eau traités au B.t.i. exclusivement.

5. RESULTATS ET DISCUSSION

Avant l'injection, un échantillon a été récolté dans chaque ruisseau et une concentration de 0,004 x 10^4 U.F.C./l. a été détectée dans un des cours d'eau (tableau 1). Une contamination occasionnée par la circulation du personnel dans le cours d'eau lors de l'organisation du traitement pourrait expliquer cette présence d'insecticide. Le prélèvement effectué dans l'autre cours d'eau ne contenait aucune trace de B.t.i.. Il est à noter qu'aucune pulvérisation de B.t.k. n'a été effectuée antérieurement à moins de 14 kilomètres de ces cours d'eau.

Immédiatement après le traitement et 100 m en aval du site d'injection, le maximum, soit 0,60 x 10^4 U.F.C./l fut observé dans l'eau du ruisseau lent. Par la suite, les concentrations diminuent rapidement et des quantités de 0,0021 x 10^4 et 0,0038 x 10^4 U.F.C./l sont détectées respectivement après 2 et 24 heures. Dans le ruisseau rapide, les valeurs sont demeurées faibles à chaque délai et varient de N.D. ($< 0,001 \times 10^4$ U.F.C./l) à 0,0028 x 10^4 U.F.C./l.

L'échantillonnage réalisé à 1,5 km en aval des sites d'injection démontre à cet endroit l'absence de B.t.i. dans le ruisseau lent et des quantités de 0,009 x 10^4 et 0,0066 x 10^4 U.F.C./l dans le cours d'eau rapide après 2 et 24 heures.

Ces résultats sont très faibles comparativement aux concentrations de B.t.k. détectées dans les cours d'eau après des pulvérisations contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette. En effet, le suivi environnemental de 1984 et de 1985 dans les milieux lotiques situés à l'intérieur des superficies traitées révèle l'apparition des maximums dans l'eau immédiatement après la pulvérisation. En 1984, sept ruisseaux ont été visités entre 0,25 et 2 heures après le traitement sur le bassin versant et les concentrations maximales variaient de 51,5 x 10^4 à 500 x 10^4 U.F.C./l (Dugal et al., 1985). Le suivi de 1985 comprenait des récoltes dans 15 ruisseaux et les maximums étaient similaires à ceux observés en 1984 (Delisle et al., 1986). La valeur minimale détectée en 1984 et 1985 durant les deux premières heures suivant la pulvérisation est de 7,0 X 10^4 U.F.C./l.

Plusieurs facteurs rendent la comparaison difficile entre les concentrations détectées dans les milieux lotiques suite à une injection ou au moyen d'une pulvérisation.

L'évaluation des concentrations étant basée sur le dénombrement des spores viables dans les échantillons, une première constatation importante est la faible quantité de spores viables dans le produit technique B.t.i. (4×10^6 spores/litre) comparativement à celle dénombrée dans les préparations opérationnelles de B.t.k ($5,3 \times 10^{12}$ spores/litre) pulvérisées en 1985 (Cimon et Marotte, 1987). Ainsi, lorsque des volumes identiques de ces deux variétés de B.t. sont introduits dans un cours d'eau, la proportion initiale des spores de B.t.i. est 1 000 000 fois inférieures.

D'autres facteurs, telle la dilution de l'insecticide, l'hétérogénéité provoquée par des arrêts durant le traitement et la vitesse de déplacement de la colonne d'eau contaminée vers l'aval expliqueraient ces résultats. De cette façon, il est possible que les concentrations détectées en 1986 après l'injection de B.t.i. soient peu représentatives des valeurs maximales présentes durant les 15 minutes de pompage. Le délai et la distance séparant le site d'injection et les stations d'échantillonnage ont sans doute favorisé la dilution et la dispersion des spores dans le cours d'eau. De plus, ce comportement de la spore est différent de celui observé lors des pulvérisations contre la T.B.E. où les concentrations sont peu variables durant les premières heures suivant la pulvérisation. Dans ce dernier cas, l'uniformité du produit dans l'eau serait principalement due à sa distribution sur l'ensemble du bassin versant lors du traitement.

L'étude de 1986 démontre que des concentrations faibles ont été détectées à 0,1 et 1,5 km en aval du site d'injection dans un cours d'eau à écoulement rapide. Par contre, dans le ruisseau à débit lent, seuls les échantillons prélevés à 0,1 km ont révélé la présence de B.t.i. en faible quantité. Dans ce cours d'eau, la sédimentation du larvicide facilitée par le faible débit peut expliquer l'absence de B.t.i. à la station située à 1,5 km en aval.

D'après l'ensemble des résultats, les quantités de spores introduites dans les cours d'eau pour le contrôle des simulidés auraient peu d'influence sur celles détectées en milieu lotique par le M.E.R. lors du suivi environnemental des pulvérisations contre la T.B.E. Cependant, on devra tenir compte de tous les projets utilisant le B.t.i. à proximité des aires de pulvérisations. En effet, ils pourraient expliquer parfois des faibles concentrations retrouvées à l'extérieur des aires traitées (ex: eau potable) ou reliées à des études de persistance. Dans une telle situation, il serait indispensable d'effectuer des analyses biochimiques ou immunologiques sur les microorganismes concernés afin de déterminer leur souche.

TABLEAU 1: Concentrations de *Bacillus thuringiensis*, variété *israelensis*, détectées dans des ruisseaux traités en 1986

	Concentrations (U.F.C. x 10^4/l)			
Ecoulement	Lent		Rapide	
Distance (m) en aval du point d'injection	100	1500	100	1500
Station / Délai de récolte	A	B	C	D
PRE	N.D.*	-	0,0040	-
0	0,60	-	0,0028	-
2 heures	0,0021	N.D.	N.D.	0,0090
24 heures	0,0038	N.D.	0,0026	0,0066

*N.D.: < 0,001 x 10^4 U.F.C./l

BIBLIOGRAPHIE

BIZAILLON, S. Cégep de Hauterive. Comm. Pers. janvier 1987.

CIMON, A. et P.-M. MAROTTE, 1987, Évaluation du dépôt de Bacillus thuringiensis à l'intérieur et à l'extérieur des secteurs traités au Québec contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette en 1984 et 1985, Québec, Gouvernement du Québec, ministère de l'Energie et des Ressources, Service des études environnementales (rapport en préparation).

COLLINS, C.H. et P.M. LYNE, 1984, Counting micro-organisms, dans Microbiological Methods, chap. 9, pp. 128-130.

DELISLE, S., R. DOSTIE et P.-M. MAROTTE, 1986, Comportement du Bacillus thuringiensis en milieu lotique à l'intérieur des aires traitées, Québec, Gouvernement du Québec, ministère de l'Energie et des Ressources, Service des études environnementales, 15 p.

DUGAL, J., L. MAJOR, P. CARDINAL et D. DELISLE, 1985, Etude de la persistance des insecticides biologiques dans les eaux naturelles en milieu forestier, Québec, Gouvernement du Québec, ministère de l'Energie et des Ressources, Service d'entomologie et de pathologie, 29 p.

GAUGLER, R. 1982, Review of Bacillus thuringiensis var. israelensis (serotype 14) as a biological control agent of black flyes (simulidae), dans Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, vol.12, no.4, 30 p.

Gouvernement du Québec
Ministère de l'Énergie et des Ressources
Service des études environnementales